Aus dem Institute für Pharmakologie und physiologische Chemie
zu Rostock.

Beiträge zur Kenntnis der chemischen Natur und des biologischen Verhaltens des Ricins.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Universität zu Rostock

vorgelegt

von

George Reid
aus Stettin.

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

Rostock.
Rats- und Universitäts-Buchdruckerei von Adlers Erben, G. m. b. H.
1914.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
zu Rostock.

Referent: Herr Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Kobert.

Die chemische Natur des 1887 von Stillmark[1]) unter Koberts Leitung gefundenen, in den Ricinussamen enthaltenen Giftes, Ricin genannt, ist schwer zu ergründen. Von Stillmark wurde das Ricin als in die Gruppe der damals als pflanzliche Albumosen bezeichneten Eiweißkörper gehörig angesprochen. Cushny[2]) warf dann die Frage auf, ob das wahre Gift nicht etwa den Eiweißkörpern des Ricinussamens nur anhänge, selbst aber kein Eiweiß sei. Er stellte ferner ebenso wie Franz Müller[3]) die Behauptung auf, das wirksame Prinzip im Ricinussamen sei ein Gemisch zweier Substanzen, eines Agglutinins und eines Toxins. Müller glaubte insbesondere das auf den lebenden Organismus wirksame Prinzip des Ricins scharf von dem die Blutwirkung in vitro bedingenden scheiden zu müssen. Lau[4]) hat nun bereits in einer unter Koberts Leitung ausgeführten Arbeit auf die Fähigkeit des Ricins, sich mit Blutkörperchen nicht nur, sondern auch mit vielen lipoidreichen Zellen des Körpers der Menschen und Tiere chemisch verbinden zu können, hingewiesen.

---

[1]) H. Stillmark: Arbeiten des pharmakologischen Instituts zu Dorpat, herausg. v. Kobert, Bd. **3.** Stuttgart 1889. S. 59.

[2]) Arth. Cushny: Archiv f. experimentelle Pharmakologie und Pathologie, Bd. **41**, 1898, S. 439.

[3]) Franz Müller: Archiv f. experimentelle Pharm. u. Pathologie, Bd. **42**, 1899, S. 302.

[4]) Fr. Lau: Inaugur.-Diss. Rostock 1901. Über vegetabilische Blutagglutinine.

Ich hoffe im nachstehenden durch entsprechende Versuche nachweisen zu können, daß diese Wirkung auf die Körperzellen durch dieselbe Substanz, die auf die Blutkörperchen agglutinierend wirkt, bedingt ist, daß mithin das Toxin und Agglutinin identisch sind.

I. Versuche über die Einwirkung von Ricin auf isolierte Gehirnzellen.

Von den zu meinen Versuchen verwendeten Körperzellen erwiesen sich die Gehirnzellen als am schnellsten von der Wirkung des Ricins betroffen. Verwendet wurde das Ricin durchweg in Form eines Auszuges aus schalenfreiem entölten Ricinussamen, der in folgender Weise dargestellt wurde. 10 g enthülste Ricinusbohnen wurden im Mörser mit 95 % Alkohol unter Zusatz von etwas Äther verrieben und dann der Alkohol-Äther abfiltriert und zwar möglichst rasch. Der Filterrückstand wurde vermittels einer Saugpumpe mit etwas Äther gewaschen und getrocknet, dann in 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und nach einstündigem Stehen bei 37° im Wasserbad filtriert.

Auf unentölte Samen berechnet war der so entstandene Auszug 10 % ig, auf entfettete aber noch nicht einmal 5 % ig. Bedenkt man ferner, daß ja die Hauptmenge des Samenpulvers ungelöst bleibt, so ergibt sich statt 5 % weniger als 2 % gelöste Stoffe in dem Auszuge. Von diesen gelösten Stoffen ist ferner nach Osborne[1]) nur ein ganz kleiner Teil Ricin. Man kann für die von mir benutzten Samen die Osbornesche Angabe, daß 1 % des von Schalen und Fett befreiten Samenpulvers reines Ricin ist, gelten lassen. Meine Lösung ent-

[1]) Thomas B. Osborne: The vegetable Proteins. Newyork 1909. — Derselbe in Abderhalden, Handlexikon, Abschnitt über die pflanzlichen Eiweißstoffe. An beiden Stellen weitere Literatur.

hielt danach in 100 ccm weniger als 5 g fettfreie Samensubstanz und demgemäß weniger als 0,05 g Ricin. 1 ccm meiner Lösung enthielt also noch nicht 0,5 Milligramm Ricin. Ich will im nachstehenden aber 0,5 mg dafür rechnen.

1. Versuch. Ganz frische blutfreie Gehirnzellen vom Hunde werden in fein verriebenem Zustand in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, die gröberen Partikel durch ein feines Maschennetz abfiltriert. Durch wiederholtes Waschen mit NaCl-Lösung und Absetzenlassen der Zellen gelingt es, dieselben bis auf minimale Spuren von Blutkörperchen zu befreien, so daß der etwaige Einwand, die später zu besprechende Agglutination sei eine sekundäre Folge, betreffe eigentlich nur die Blutkörperchen und die Organzellen würden nur mitgerissen, durchaus hinfällig wird. Es werden 3 Gläser aufgestellt mit je 4 ccm Flüssigkeit und zwar 1, 2 und 3 ccm Flüssigkeit des oben beschriebenen Ricinusauszuges, entsprechend 0,5 mg, 1 mg und 1,5 mg Ricin + 3 bezw. 2 und 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Zu diesen 3 Gläsern wird dann je 1 ccm der hergestellten Hundehirnzellenaufschwemmung hinzugefügt. Ebenso werden die 3 Kontrollgläser mit 4 ccm NaCl-Lösung + 1 ccm Hundehirnzellenaufschwemmung aufgestellt. Nach einer Viertelstunde tritt in den Ricingläsern bereits deutliche Schichtung in eine klare obere und dicke untere Schicht ein und bei der Filtration des mit 3 ccm Ricinusauszug versetzten Glases gehen wasserklare Tropfen durch das Filter, wogegen die Kontrolle trübe durchfiltriert. Nach dem Umschütteln sämtlicher übrigen Gläser ist bereits nach 25 Minuten in den Ricingläsern wieder ein dicker Bodensatz zu sehen, wogegen die Kontrollgläser unverändert erscheinen.

2. Versuch. Wie in Versuch 1 hergestellte doppelt gewaschene in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Hirnzellen vom Hund werden in der Menge von je 4 ccm zu 2 Versuchsgläsern mit 1 ccm physiologischer NaCl-Lösung und 1 ccm Ricinusauszug, entsprechend 0,5 mg Ricin, hinzugesetzt. Schon in der ersten Minute tritt in dem mit Ricinlösung versetzten Glase eine auffallende Erscheinung ein, indem die Gehirnzellen sich zusammenballen wie die Blutkörperchen bei der Agglutination und in Klumpen zu Boden fallen. Betrachtet man einen Tropfen aus beiden Gläsern unter dem Mikroskop, so sieht man das eine Mal zusammengeballte Zellen miteinander verklebt und stets

haufenweise bei einander liegen, wogegen in dem Tropfen, der der Flüssigkeit ohne Ricinlösung entnommen ist, die Zellen gleichmäßiger verteilt und einzeln liegend sichtbar sind.

3. Versuch. Von den wie zu Versuch 1 und 2 hergestellten Hundehirnzellen in NaCl-Lösung werden nun größere Mengen, je 25 ccm, benutzt und diese mit 5 ccm des Ricinusauszugs, entspr. 2,5 mg Ricin, bzw. mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Man sieht hier, wie in den vorhergehenden Versuchen bereits nach 10 Minuten in dem Ricinglas deutliche Schichtung und Zusammenballung der Zellen eintreten, im Kontrollglas aber nichts davon.

Ehe ich diese drei Versuche fortsetze, sind die für alle 3 Versuche nötigen Prozeduren zu erklären. Der Sinn dieser nachstehend besprochenen Prozeduren ist folgender. K. Landsteiner[1]) hat entdeckt, daß man an Blutkörperchen verankertes Ricin durch Salzsäure wieder in Freiheit setzen kann. Nach L. v. Liebermann[2]) soll dies dadurch zu erklären sein, daß sich das Ricin zum Protoplasma der Zellen wie eine schwache Säure verhalte. Es verbinde sich mit ihnen wie schwache Säuren mit Basen. Werde nun der Zellenbrei mit einer starken Säure versetzt, so wird das Ricin als schwache Säure frei. Die Tatsache daß es frei wird, ist allerdings richtig; die von L. v. Liebermann aber gegebene Erklärung, daß Ricin eine Säure sei, wurde von Pauli[3]) widerlegt, da es sich im elektrischen Gefälle nicht wie eine Säure, sondern wie eine amphotere Substanz, d. h. gerade so wie die neutralen Eiweiße insgesamt verhält. Genug, man kann aus dem Agglutinat von Blutkörperchen oder anderen Zellen das verankerte

---

[1]) K. Landsteiner, Münch. med. Wchschr. 1904, Nr. 27.

[2]) L. v. Liebermann, Arch. f. Hygiene, Bd. 62, 1907, Heft 4.

[3]) Pauli, 25. Kongr. f. innere Med.; Wiener med. Wochenschrift 1908, Nr. 18.

Ricin durch Salzsäure freimachen und kann entweder in saurer Lösung oder sofort nach dem Neutralisieren abfiltrieren. Bei längerem Stehen in nicht mehr saurer Flüssigkeit verbindet es sich von neuem mit den Zellensubstanzen.

Die Flüssigkeit aus dem mit Ricinlösung versetzten Glase wird filtriert. Das Filter mit dem Filterrückstand der agglutinierten Hundehirnzellen wird mit 5 ccm NaCl-Lösung + 1 Tropfen verdünnter Salzsäure versetzt, nach einer halben Stunde neutralisiert und rasch filtriert. Die Hundehirnzellen bleiben nun auf dem Filter zurück, das Ricin geht in das wasserklare Filtrat. Setzt man zu diesen 5 ccm des ricinhaltigen Filtrates 2 ccm einer 2 % Katzenblutkörperchensuspension, so agglutiniert diese sofort total.[1]) Beim Filtrieren bleiben die agglutinierten Blutkörperchen in Form feinverteilter siegellackartiger Klümpchen auf dem Filter zurück.

Behandelt man ebenso das Kontrollglas mit 25 ccm Hundehirnzellenaufschwemmung + 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, wie vorher beschrieben, so agglutinieren die zugesetzten Katzenblutkörperchen nicht und beim Abfiltrieren gehen Blutkörperchen durch das Filter hindurch, ohne die charakteristischen fein verteilten siegellackartigen Klümpchen zu hinterlassen.

Ergebnis: Durch diese 3 Versuche ist erwiesen, daß die mehrmals gewaschenen Hirnzellen vom Hunde bei Zusatz von physiol. Na Cl-Lösung und Ricinauszug sich zu Klumpen agglutinieren, wie mit bloßem Auge und mit dem Mikroskop nachzuweisen ist. Auch nach eintägigem Stehen läßt sich aus diesen Klumpen auf dem Filter durch Waschen mit Na Cl-Lösung das Ricin nicht entfernen. Wohl aber kann man diesen Zellen durch verdünnte Salzsäure das

---

[1]) Alle Agglutinationsversuche mit Blut und anderen Zellen wurden von mir bei Stubentemperatur vorgenommen, also nicht im Brüteschrank. V. Kafka hat gezeigt, daß auch für Bakterienagglutination Stubentemperatur ausreichend ist. Vgl. Cbl. f. Bakteriol., Erste Abt., Originale Bd. **40**, 1906, S. 559.

Ricin entziehen, und dann durch den Blutversuch zeigen, daß es sich an Blutkörperchen verankert und prompt und stark agglutinierend wirkt. Damit ist bewiesen, daß in den Zellen des Hundehirns nicht nur Toxin, sondern auch Agglutinin verankert war, was für die Annahme spricht, daß beide wohl dieselbe Substanz sind. Da diese Substanz erst an Hundehirnzellen gebunden war und sich dann mit Blutkörperchen der Katze verband, kann sie nicht artspezifisch sein.

Versuch 4. Eine Portion Hundehirnzellen, die wie in den vorigen Versuchen hergestellt und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt ist, wird mit Formalin gehärtet zur Konservierung und nach 3 Tagen je 25 ccm mit 5 ccm des obenerwähnten Ricinusauszuges und mit 5 ccm einer physiolog. Kochsalzlösung versetzt. Beide Portionen werden nach einstündigem Stehen filtriert, nach welcher Zeit sich in dem mit 5 ccm Ricinlösung versetzten Glase eine deutliche Schichtung der Flüssigkeit bemerkbar gemacht hat.

Durch das Filter geht eine leicht trübe Flüssigkeit, von der sich zeigen läßt, daß sie auf Blutkörperchen nicht agglutinierend wirkt, was beweist, daß die zugesetzten 5 ccm Ricinlösung total von den Zellen gebunden sein müssen. Die Filterrückstände werden wie in Versuch 3 mit NaCl-Lösung und einem Tropfen verdünnter Salzsäure versetzt, nach halbstündigem Stehen neutralisiert, filtriert und die Filtrate mit 2% Igelblut versetzt. Nach 12 Stunden zeigt sich in den mit Igelblut versetztem Filtrate, welches von den mit Ricinlösung versetzten Hundehirnzellen stammt, Agglutination der Blutkörperchen, wogegen das Filtrat der nur mit NaCl-Lösung versetzten Hundehirnzellen keine Agglutination zeigt, ebenso wie eine Kontrollprobe von physiolog. Kochsalzlösung + einer entsprechenden Menge der verwandten Ricinlösung.

Versuch 5. 50 ccm Igelgehirnzellen, die in physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt, ebenso zubereitet sind wie die Hundehirnzellen in Versuch 1, werden in 2 Portionen geteilt und dann aufgestellt.

a) 25 ccm Igelgehirn + 2 ccm 10 % Ricinauszug;
b) 25 „ „ + 2 „ NaCl-Lösung.

Die erste Portion zeigt nach wenigen Minuten deutliche Zusammenballung der zu Boden sinkenden Zellen und eine darüberstehende klare Schicht der Flüssigkeit. Nach 12 Stunden werden beide Portionen filtriert, von dem Filtrat zur Agglutinationsprobe Gläser aufgestellt und ein Kontrollglas.

1. 4 ccm Filtrat von a (d. h. Hirn + Ricinlösung) + 1 ccm 3 % Hühnerblut.
2. 4 ccm Filtrat von b (d. h. Hirn + NaCl-Lösung) + 1 ccm 2 % Hühnerblut.
3. 4 ccm physiolog. NaCl-Lösung + 1 ccm 2 % Hühnerblut.

Der Filterrückstand beider Portionen wird in der oben beschriebenen Weise behandelt und schließlich auch mit 2 % Hühnerblutsuspension versetzt, wobei das aus Portion a stammende Endfiltrat Agglutination bewirkt, das aus Portion b stammende Endfiltrat dagegen die Blutkörperchen unverändert ließ. Die Agglutination trat auch innerhalb 12 Stunden ein, wie bei Versuch 4, wogegen in den 2 aufgestellten Gläsern des ersten Filtrats sowie in der Kontrolle 3 ebenfalls die Agglutination, wie erwartet, ausblieb.

Versuch 6. 25 ccm in NaCl wie oben beschrieben hergestellte aufgeschwemmte Katzenhirnzellen werden mit 5 ccm Ricinusauszug versetzt als Portion a aufgestellt und 25 ccm Katzenhirnzellen + 5 ccm NaCl als Portion b. Im ersten Glase treten wiederum die bekannten Erscheinungen der Zusammenballung und Schichtung auf. Beide Portionen werden filtriert, die Filtrate wie in Versuch 5 nur diesmal mit 2 % Katzenblut zur Agglutinationsprobe angestellt, die nach 12stündiger Beobachtung negativ ausfällt. Die Filterrückstände von a und b, in der üblichen Weise behandelt, ergeben mit 2 %iger Suspension von Katzenblut versetzt, Folgendes. Bei Portion a zeigt das Endfiltrat deutliche Agglutination, bei Portion b zeigt es keine Agglutination. Beide Portionen gelangten nach 12stündiger Beobachtungszeit zur Untersuchung. Es lassen sich auch hier, wie in Versuch 3 beschrieben wurde, die agglutinierten Blutkörperchen durch Filtrieren als feine siegellackartige Klümpchen auf dem Filter zurückhalten.

Den bisher beschriebenen Versuchen analog wurden untersucht Kaninchenhirn, Schweinehirn, Meerschweinchenhirn. Da die Versuche ganz in derselben Art durchgeführt wurden wie die vorhergehenden, seien sie nur kurz angeführt.

Versuch 8. a) 25 ccm Kaninchenhirnaufschwemmung + 5 ccm Ricinlösung, enthaltend 2,5 mg Ricin; b) 25 ccm Kaninchenhirnaufschwemmung + 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination des aus dem Zellagglutinat wieder freigemachten Ricins mit 2% Kaninchenblut 3 Stunden nach Ansetzen mit dem Blut.

Versuch 9. a) 25 ccm Kaninchenhirnaufschwemmung + 5 ccm derselben Ricinlösung; b) 25 ccm Kaninchenhirnaufschwemmung + 5 ccm NaCl. Agglutination des aus dem Zellagglutinat wieder freigemachten Ricins mit 2% Meerschweinchenblut sofort nach Zusatz des Blutes.

Versuch 10. a) 25 ccm Schweinehirnzellenaufschwemmung + 5 ccm derselben Ricinlösung; b) 25 ccm Schweinehirnzellenaufschwemmung + 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination des aus dem Zellagglutinat wieder freigemachten Ricins mit 2% Kalbsblut nach 12 Stunden.

Versuch 11. a) 25 ccm Schweinehirnzellenaufschwemmung + 5 ccm Ricinlösung; b) 25 ccm Schweinehirnzellenaufschwemmung = 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination des aus dem Zellaglutinat wieder freigemachten Ricins mit 2% Meerschweinchenblut nach Zusatz des Blutes sofort erfolgend.

Versuch 12. a) 12 ccm Meerschweinchenhirn + 2 ccm Ricinlösung; b) 12 ccm Meerschweinchenhirnaufschwemmung + 2 ccm NaCl-Lösung. Agglutination des aus dem Zellagglutinat wieder freigemachten Ricins mit 2% Katzenblut 2 Stunden nach Zusatz des Blutes.

Durch vorstehende Versuche glaube ich dargetan zu haben,

1) daß ricinhaltige Auszüge aus entölten Ricinussamen die gewaschenen isolierten Zellen des Gehirns von Hund, Igel, Kaninchen,

Schwein und Meerschweinchen agglutinieren;

2) daß sich dabei das Ricin in den Zellen „verankert“ oder wie wir im Sinne der physikalischen Chemie es wohl ausdrücken müssen, daß das Ricin dabei von den Zellen adsorbiert wird. Durch physiol. Kochsalzlösung kann das Gift in diesem Stadium den Zellen dann nicht entzogen werden;

3) daß verdünnte Salzsäure das Gift wieder frei macht, so daß es (auch noch sofort nach dem Neutralisieren) jetzt ausgezogen werden kann;

4) daß dieses freigemachte Toxin sich jetzt an Blutkörperchen ganz anderer Tiere verankern und diese agglutinieren kann, d. h. daß es als Agglutinin wirkt. Dies läßt sich nur unter der Annahme erklären, daß ein und dieselbe Substanz sich sowohl mit Gehirn als auch mit Blutkörperchen verbindet, d. h. daß Ricintoxin der Gehirnzellen und Ricinagglutinin beliebiger Blutkörperchen identisch sind.

II. Versuche über die Einwirkung von Ricin auf isolierte Leberzellen.

In einer Arbeit „Beitrag zur Frage der entgiftenden Rolle der Leber im tierischen Organismus“ ist W. N. Woronzow[1]) unter anderem zu folgendem Ergebnis gekommen: Durchströmt man die entblutete Leber von Kaninchen, Katzen mit Ringerlösung + O_2 unter Zusatz von Curare, Nikotin, Aconitin, Muscarin, Digitalin, Atropin, Physostignin, Ricin, Pilocarpin, Phenol, Strychnin, Adrenalin, so werden diese Gifte teilweise,

[1]) Woronzow, Beitr. z. Frage d. entgiftenden Rolle d. Leber im tierischen Organismus. Diss. Dorpat 1910.

Ricin und Muscarin aber total entgiftet, wohl weil das Organ einen Teil des Giftes verankert. Analog den nun bisher beschriebenen Versuchen mit den Hirnzellen verschiedener Tiere schien es mir auf Woronzows Versuche hin lohnend, analoge Versuche auch mit Leberzellen anzustellen. Man kann auch diese in zerriebenem, blutfreiem Zustande gewinnen. Es mußte nur festgestellt werden, ob sie sich in diesem Zustande mit dem Ricin verbinden und ob man es ihnen dann durch das oben beschriebene Verfahren wieder entziehen und durch den Blutversuch die Agglutinationswirkung des Giftes erweisen kann.

Versuch 13. a) 20 ccm blutfreie Igelleberaufschwemmung + 2 ccm meines oben beschriebenen Ricinusauszugs; b) 20 ccm Igelleberaufschwemmung + 2 ccm NaCl-Lösung.

In a tritt nach einer Stunde deutliche Schichtung ein, in Glas b keine Veränderung. Beide Portionen werden filtriert, und die Filtrate mit 2% Hühnerblut angesetzt. Sie ergeben keine Agglutination, was beweist, daß in den mit Ricin versetzten Flüssigkeitsmengen das Ricin an die Leberzellen gebunden ist. Die Filterrückstände werden in der oben beschriebenen Weise mit Salzsäure behandelt, und es ergibt sich nach Zusatz von 2 % Suspension von Hühnerblut in dem Endfiltrat von a nach 12 Stunden Agglutination, in dem Endfiltrat von b keine Agglutination.

Versuch 14. a) 20 ccm blutfreie Katzenleberaufschwemmung + 2 ccm Ricinusauszug; b) 20 ccm Katzenleberaufschwemmung + 2 ccm NaCl-Lösung. Agglutination durch das wieder freigemachte Ricin erfolgte mit 2 % Suspension von Hühnerblut nach 12 Stunden.

Versuch 15. a) 25 ccm blutfreie Froschleberaufschwemmung + 5 ccm Ricinauszug. b) 25 ccm Froschleberaufschwemmung + 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination durch das wieder freigemachte Ricin erfolgte nach Zusatz von 2 % Suspension von Katzenblut wenige Minuten später.

Versuch 16. a) 25 ccm blutfreie Kaninchenleberaufschwemmung + 5 ccm Ricinauszug; b) 25 ccm Kanin-

chenleberaufschwemmung + 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination durch das wieder freigemachte Ricin erfolgte mit 2 % Suspension von Kaninchenblut nach 3 Stunden.

Versuch 17. a) 25 ccm blutfreie Meerschweinchenleberaufschwemmung + 5 ccm Ricinauszug; b) 25 ccm Meerschweinchenleberaufschwemmung + 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination durch das wieder freigemachte Ricin erfolgte mit 2 % Suspension von Meerschweinchenblut sofort nach Zusatz des Blutes.

Nach den Versuchen des ersten Kapitels hätte man versucht sein können zu glauben, daß das Ricin nur zwei Wirkungen besitze, deren erste darin besteht, sich mit Gehirnzellen zu verbinden, und die toxischen in vita beobachteten Wirkungen des Giftes erklärt, während die zweite im Reagenzglasversuch mit Blut zu erzielende Wirkung als Hämagglutination zu bezeichnen ist. Die obigen Versuche zeigen, daß damit die Wirkungen des Ricins nicht erschöpft sind; es hat auch die Fähigkeit, sich mit Leberzellen zu verbinden. So wird es verständlich, daß bei innerer Darreichung von Ricin eine hundert mal größere Dose nötig ist, als bei subkutaner Applikation. Von dem dem Entgiftungsprozeß durch Trypsin entgangenen resorbierten Gifte bleibt eben der größte Teil bei Durchgang durch die Leber in dieser sitzen, und das Gehirn bleibt vor der Einwirkung dieses Teiles verschont. Meine Versuche bilden also eine Ergänzung der von Woronzow angestellten.

III. Über die Einwirkung des Ricins auf isolierte Zellen noch anderer Organe.

Nachdem es mir gelungen war, das Ricin an Gehirn- und an Leberzellen zu ketten, schien der Versuch, es

auch in anderer Weise noch zu binden, berechtigt. Das Nachstehende zeigt, welche Zellarten ich dazu herangezogen habe.

Versuch 19. a) 25 ccm blutfreie Meerschweinchennierenzellen aufschwemmung + 5 ccm der zu allen früheren Versuchen benutzten Ricinlösung; b) 25 ccm ebensolche Meerschweinchennierenzellenaufschwemmung + 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination durch das wieder freigemachte Ricin erfolgte mit 2 % Suspension von Meerschweinchenblut sofort nach Zusatz des Blutes.

Versuch 20. a) 25 ccm Aufschwemmung von blutfreien Kalbsthymuszellen + 5 ccm Ricinlösung; b) 25 ccm ebensolche Kalbsthymuszellen + 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination durch das wieder freigemachte Ricin erfolgte mit 2 % Suspension von Kalbsblut nach 12 Stunden.

Versuch 21. a) 25 ccm blutfreie Kalbsmilzzellenaufschwemmung + 5 ccm Ricinlösung; b) 25 ccm ebensolche Kalbsmilzzellenaufschwemmung + 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination durch das wieder freigemachte Ricin erfolgte mit 2 % Suspension von Kalbsblut nach 12 Stunden.

Bei Versuch 20 und 21 tritt bei Verwendung von 2 % Meerschweinchenblut sofort nach Zusatz dieses Blutes Agglutination ein.

Versuch 22. a) 15 ccm Aufschwemmungen von blutfreien Hundedünndarmzellen + 5 ccm Ricinlösung; b) 15 ccm derselben Hundedünndarmzellen + 5 ccm NaCl-Lösung. Agglutination durch das wieder freigemachte Ricin erfolgte mit 2 % Suspension von Hundeblut wenige Minuten nach Zusatz des Blutes. Die Dünndarmzellen waren mit einem stumpfen Messer von der sehr gut gereinigten Darmschleimhaut abgeschabt und in derselben Weise zubereitet worden wie die Hirnzellen vom Hunde. Das sie begleitende Mucin hatte die Agglutination nicht verhindert.

Somit muß als bewiesen gelten, daß auch Nieren-, Milz-, Dünndarm- und Thymuszellen Ricin zu verankern vermögen. Ich komme also zu dem Ergebnis, daß die Fähigkeit, das Ricin der umgebenden Flüssigkeit zu entziehen, wohl allen oder jedenfalls

recht verschiedenartigen (drüsigen und nichtdrüsigen) Zellen zukommt. Es läßt sich daraus schließen, daß bei der Ricinvergiftung wohl die verschiedensten Organe in Mitleidenschaft gezogen werden, und das Gift dem vorbeiströmenden Blute entziehen und wenigstens zeitweise speichern. Einige Organe wie das Gehirn werden dabei rasch funktionsunfähig, während in anderen nur ein Teil der Zellen erkrankt. Eine Trennung des Ricins in ein Toxin und in ein Agglutinin, von denen das letztere intra vitam keine Rolle spiele, erscheint unter solchen Umständen nicht mehr berechtigt, sondern wir müssen sagen: Die Agglutination des Protoplasmas lebenswichtiger Organe, namentlich des Gehirns, bildet das toxische Moment, an dem der Organismus bei der Ricinvergiftung stirbt. Das Blut kann in diesem Stadium bereits wieder völlig ricinfrei sein und gegen neu zugesetztes Ricin im Reagenzglas bei 50 bis 100facher Verdünnung wie normales Blut reagieren.

IV. Analoge Versuche mit den beiden käuflichen Ricinpräparaten und dem käuflichen Bohnenphasin (Merck).

Außer dem oben beschriebenen in Kap. I—III durchgängig verwendeten 10 %igem Ricinauszug wurden nun Versuche angestellt mit folgenden Lösungen. In 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung werden aufgelöst: 1,4 g Ricin-Merck, 1,5 g Ricin-Schuchardt und 1,25 g Bohnengift. Betreffs dieser Präparate sind folgende Bemerkungen nötig. Das Ricin-Merck ist nach der Dialysenmethode und das Ricin-Schuchardt nach der Methode der Alkoholfällung dargestellt, d. h.

beide sind auf prinzipiellen ganz verschiedenen Wegen abgeschieden. Das Bohnengift Phasin ist nach der Alkoholfällungsmethode, wie sie von Wienhaus[1]) und Aßmann[2]) beschrieben ist, dargestellt worden. Nach vierundzwanzigstündigem Stehen im Wasserbad bei 38° werden die Lösungen filtriert; das Filtrat enthält nun den löslichen organischen Anteil dieser 3 Präparate und zwar nach Ausschaltung der Asche und der unlöslich bleibenden Teile gerade in 1 % Lösung. In dieser Lösung befindet sich auch das Ricin, dessen genauere Mengenbestimmung aber fehlt.

Es werden aufgestellt von einem Schweinchen

1) 10 ccm blutfreie Hirnzellen + 5 ccm Bohnenphasin (0,05 Lösliches).
2) 10 ccm blutfreie Hirnzellen + 5 ccm Ricin-Schuchardt (0,05 Lösliches).
3) 10 ccm blutfreie Hirnzellen + 5 ccm Ricin-Merck (0,05 Lösliches).
4) 10 ccm blutfreie Hirnzellen + 5 ccm 0,9 % NaCl-Lösung.

Die ersten drei Gläser agglutinieren sofort, ebenfalls werden aufgestellt:

1) 10 ccm blutfreie Leberzellen + 5 ccm Bohnenphasin (0,05 Lösliches).
2) 10 ccm blutfreie Leberzellen + 5 ccm Ricin-Schuchardt (0,05 Lösliches).
3) 10 ccm blutfreie Leberzellen + 5 ccm Ricin-Merck (0,05 Lösliches).
4) 10 ccm blutfreie Leberzellen + 5 ccm NaCl-Lösung.

Auch hier agglutinieren die drei ersten Gläser sofort. Behandelt man nun die mit Ricin versetzten Gläser, welche Hirnaufschwemmung enthalten, ebenso wie die Gläser, welche Leberaufschwemmung enthalten, nach der in den obigen Versuchen beschriebenen Weise, so läßt sich auch hier zum Beispiel mit 2 % Hammelblut zum Schluß Agglutination nachweisen.

---

[1]) Wienhaus, Zur Biochemie des Phasins. Biochem. Ztschr. **18**, 1909, H. 3—5.

[2]) Fr. Aßmann, Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Agglutinine. Pflügers Arch., Bd. **137**, 1911, S. 489.

Ergebnis: Diese Versuche beweisen, daß die beiden Handelspräparate von Ricin sich wie mein selbsthergestellter Ricinusauszug verhalten, das heißt, daß sie sich erst an Organzellen und nach dem Freimachen daraus an Blutkörperchen verankern lassen, mithin eine einheitlich-wirksame Substanz enthalten, die eben das Ricin sein muß. Weiter ergeben obige Versuche, daß auch die ganz ungiftige agglutinierende Substanz der Bohnen, das sog. Bohnenphasin, in analoger Weise wie das Ricin sich sowohl mit Organzellen einerseits und Blutzellen andrerseits verbinden kann, und daß es möglich ist, das aus den Organzellen abgeschiedene Phasin nun nachträglich mit Blutkörperchen zu verankern. Folglich kann auch hier nicht ein Toxin neben einem Agglutinin angenommen werden, sondern sowohl beim Ricin als beim Bohnenphasin hat ein und dieselbe Substanz zweierlei Eigenschaften, ist aber keineswegs ein Gemisch zweier ganz verschiedener Substanzen.

V. Über die Einwirkung des aus Organzellen wieder freigemachten Ricins auf lebende Tiere.

Falls meine Deduktion, daß aus den Organzellen sich wirkliches „Vollricin" abspalten und an Blutkörperchen verankern läßt, richtig ist, muß sich dies auch dadurch noch weiter erklären lassen, daß das aus den Blutkörperchen wieder abgeschiedene Agglutinin bei Einspritzung am Tier als Toxin erweist. Zu diesem Behufe wurde folgender Doppelversuch gemacht.

Isolierte blutfreie Zellen der Nebenniere eines Kaninchens und isolierte Gehirnzellen von Kaninchen

werden in physiologischer Kochsalzlösung verrieben und dann zu Versuchen aufgestellt.

Glas 1: 10 ccm Nebennierensubstanz + 1 ccm Ricin-Merck,
Glas 2: 10 „ „ + 1 „ NaCl-Lösung,

nach 3 Minuten im Glas 1 deutliche Zusammenballung der Zellen; ebenso Glas 1: 10 ccm Hirnzellen + 1 ccm Ricin,

Glas 2: 10 „ „ + 1 „ NaCl-Lösung.

Auch hier erfolgt nach 3 Minuten im Glase 1 deutliche Zusammenballung der Zellen.

Die agglutinierten Portionen, d. h. einerseits die Nebennierenzellen und andererseits die Gehirnzellen werden auf 2 Filtern gewaschen, die Filtrate von Zeit zu Zeit mit Blut geprüft, bis keine Agglutination mehr eintritt, dann beide Filterrückstände mit HCl versetzt, nach ½ Stunde neutralisiert, filtriert und mit je 5 ccm 2 % Kaninchenblut zur Agglutination angesetzt. Es ergibt sich nach ½ Stunde in beiden Fällen totale feste Agglutination. Beide Blutkörperchenagglutinate werden nun mit HCl versetzt, der Auszug neutralisiert, filtriert und die Filtrate je einem Kaninchen von 850 und 800 g Gewicht injiziert. Die Tiere starben beide nach 24 Stunden.

Ergebnis. Ein und dieselbe Substanz aus dem Ricin-Merck wurde hier erst an Organzellen (Nebennierenzellen beziehungsweise Gehirnzellen) verankert, dann daraus nach gehörigem Wegwaschen des überschüssigen Giftes aus den Zellen freigemacht, an Blutkörperchen verankert und nach gehörigem Waschen auch daraus wieder freigemacht und erwies sich nun noch als tötlich wirkend für Kaninchen. Dies läßt keine andere Deutung zu, als daß das im Ricinpräparat enthaltene Agglutinin der Organzellen, das darin enthaltene Agglutinin der Blutkörperchen und das darin enthaltene Toxin ein und dieselbe Substanz sind. Das Mercksche Ricin enthält also ebensowenig als mein eigener Ricinusauszug ein Gemisch von Ricintoxin mit Ricinagglutinin.

VI. Über den Einfluß von Lecithin und Cholesterin auf Ricin.

Wie bereits erwähnt, hat Lau[1]) seinerzeit als erster in einer unter Koberts Leitung ausgeführten Arbeit auf die Fähigkeit des Ricins, Abrins und Crotins, sich mit vielen lipoidreichen Zellen des Körpers chemisch verbinden zu können, hingewiesen. In Emulsionen von Gehirn-, Leber- und Nierenzellen des entbluteten Meerschweinchens und in den Gehirnzellen des Hammels führten die drei Gifte alsbald zur Agglutination. Die verklumpten Zellen bildeten einen Bodensatz, die darüberstehende Flüssigkeit war klar. Diese Versuche wurden in einer Arbeit von Michaelis und Steindorff[2]) 1907 nachgeprüft insbesondere mit Leberzellen, Nierenzellen und Milz des Meerschweinchens, sowie mit der Aufschwemmung eines Skirrus der Mamma und eines Karzinomes der Maus. Auch diese Autoren kamen zu dem Resultat, daß Organzellen, soweit sie sich in emulgierter Form zubereiten lassen, prinzipiell in derselben Weise agglutinierbar sind, wie rote Blutkörperchen. Ich kann mich, wie aus den Versuchen der vorstehenden Kapitel hervorgeht, dieser Ansicht durchaus anschließen.

Es liegt nun nahe zu fragen, mit welchen Stoffen das Ricin sich verbindet, und zu untersuchen, ob im Reagenzglas eventuell sich eine Verbindung von Ricin z. B. mit Lecithin oder Cholesterin herbeiführen lasse.

---

[1]) Lau, Über vegetabilische Blutagglutinine. Diss. Rostock 1901.

[2]) Michaelis u. Steindorff, Biochem. Zeitschrift, Bd. 2, 1907, S. 43.

Die folgenden zu diesem Zwecke angestellten Versuche ergaben ein negatives Resultat. Ich spreche zunächst über **Lecithin.**

Zwei Messerspitzen Lecithin-Riedel 100 % werden, in 50 % Alkohol gelöst, in der Reibschale mit der zehnfachen Menge physiologischer Kochsalzlösung verrieben; die größeren Partikel werden durch ein feines Maschennetz zurückgehalten, so daß als Versuchslösung eine feine Emulsion verwendet wird. Als Ricinlösung wurde eine 1 % Lösung von Ricin-Merck in physiologischer Na Cl-Lösung verwendet.

Versuch 1. Es werden nun aufgestellt:

a) 5 ccm NaCl-Lösung + 2 ccm Ricin-Merck.

b) 5 ccm Lecithinemulsion + 2 ccm Ricin-Merck.

Nach 24stündigem steten und wiederholten Umschütteln werden je 1 ccm von a und b zu 5 ccm 2 % Rinderblut hinzugesetzt. Nach zehn Minuten beginnt in beiden Gläsern bereits Agglutination. Nach 5 Stunden ist die obere Schicht in dem mit NaCl-Lösung versetzten Glase ganz klar, am Boden die agglutinierten Blutkörperchen, in dem mit Lecithin versetzten Glase hingegen ist die obere Schicht noch rosa gefärbt und die Agglutination nur schwach angedeutet.

Der Versuch wird wiederholt mit einer, wie oben beschrieben, zubereiteten, jedoch genau eingestellten etwa 5 % igen Lösung von Lecithin. Als Ricinlösung verwendet wurde eine 1 % Lösung von Ricin-Merck, von Ricin-Schuchardt und von Phasin-Merck in Na Cl-Lösung.

Versuch 2. Es werden aufgestellt:

1) 5 ccm Lecithin + 5 ccm Ricin-Merck.
2) 5 „ „ + 5 „ Ricin-Schuchardt.
3) 5 „ „ + 5 „ Bohnenphasin.
4) 5 „ „ + 5 „ NaCl-Lösung.

Die agglutinierende Wirkung der verwendeten Ricinlösungen wurde geprüft, indem 1 ccm jeder Lösung nach Zusatz zu 10 ccm 2 %iger Rinderblutsuspension diese stets sofort agglutinierte. Nach 24 Stunden hat sich am Boden sämtlicher Gläser eine dickere

Schicht gebildet. Es werden in den Gläsern die oberen Schichten und der Bodensatz gesondert, mit 2 % Rinderblut angesetzt und folgende Mischungen aufgestellt:

1) Obere Schicht: Lecithin + Ricin-Merck + 5 ccm 2 % Rinderbl.
2) „ „ „ + Ricin-Schuchardt + 5 ccm 2 % Rinderblut.
3) „ „ „ + Bohnenphasin + 5 ccm 2 % Rinderblut.
4) „ „ „ + NaCl-Lösung + 5 ccm 2 % Rinderb.
5) Bodensatz: Lecithin + Ricin-Merck + 3 ccm 2 % Rinderblut.
6) „ „ + Ricin-Schuchardt + 3 ccm 2 % Rinderblut.
7) „ „ + Bohnenphasin + 3 ccm 2 % Rinderbl.
8) „ „ + NaCl-Lösung + 3 ccm 2 % Rinderblut.

In den Gläsern 1, 2, 3, 5, 6, 7 tritt nach zehn Minuten deutliche beginnende Agglutination ein, was beweist, daß das Lecithin das Ricin nicht unter Inaktivierung gebunden haben kann. Nach 24 Stunden ist die Agglutination in den Lecithin-Bodensatzgläsern 5, 6, 7 ausgesprochener wie in den Gläsern 1, 2, 3.

Dieser Versuch legt den Schluß nahe, daß vielleicht das Lecithin im Bodensatz zwar mit Ricin eine Verbindung, jedoch nur eine lockere und nicht etwa inaktive eingegangen ist, da das Ricin bei Zusatz von Blut letzteres sehr schnell agglutinierte.

Durch eine andere Versuchsanordnung läßt sich ebenfalls sehr deutlich zeigen, daß das Lecithin keine inaktive Verbindung mit dem Ricin im Reagenzglas eingeht.

Versuch 3. Verwendet wird dieselbe Lecithin-Emulsion und die 1 % Ricinlösung des Merckschen Präparates. 7 ccm Lecithin + 3 ccm Ricin-Merck werden im Reagenzglas unter wiederholtem Umschütteln eine halbe Stunde im Wasserbad bei 50° gehalten, danach aufgestellt von dieser Lösung:

3 ccm (Lecithin + Ricin-Merck) + 2 ccm NaCl-Lösung + 5 ccm 2 % Taubenblut, und ebenso
3 ccm Lecithin-Emulsion + 2 ccm NaCl-Lösung + 5 ccm 2 % Taubenblut.

Nach 1½ Stunde befinden sich im ersten Glase am Boden agglutinierte Klumpen von roten Blutkörperchen. Beide Gläser werden umgeschüttelt und filtriert, es gehen dann von dem 2. Glas die Blutkörperchen durch das Filter hindurch, von dem ersten bleiben die Blutkörperchen in Form fein verteilter siegellackartiger Klümpchen auf dem Filter zurück, woraus hervorgeht, daß das Ricin sofort auf die Blutkörperchen eingewirkt hat, also nicht mit dem Lecithin eine die Agglutination störende Verbindung eingegangen sein kann.

Versuch 4. Von einer 2 % Lösung von **Cholesterin** in 80 % Spiritus wird 1 ccm zu 9 ccm 1 % Lösung von Ricin-Merck hinzugesetzt; es bildet sich sofort ein feiner Niederschlag. Die Lösung wird nun im Wasserbad bei 50° eine halbe Stunde unter wiederholtem Umschütteln gehalten und dann filtriert. Auf dem Filter bleibt das meiste Cholesterin zurück. Von dem Filtrat werden 2 ccm mit 2 ccm NaCl zur Ausschaltung der Alkoholwirkung, die ja schon zur Genüge durch die starke Verdünnung mit der NaCl-Lösung des Ricins unwirksam gemacht war, vermischt und mit 5 ccm 2 % Taubenblut versetzt. Es tritt sofort totale Agglutination ein.

Versuch 5. Derselbe Versuch wird wiederholt mit 7 ccm der 1 %igen Lösung des Ricin-Merck + 3 ccm Cholesterin. Wie in Versuch 4 wird diese Mischung im Wasserbad bei 50° eine halbe Stunde lang gehalten, dann filtriert. Die ersten 3 ccm Filtrat werden mit 3 ccm 2 % Taubenblut versetzt und nach 5 Minuten filtriert; auf dem Filter bleiben agglutinierte Blutkörperchen zurück. Ebenso wird der Rest des Filtrates mit 3 ccm Taubenblut versetzt und nach 5 Minuten filtriert; auch hier blieben die roten Blutkörperchen agglutiniert als siegellackartige Maße auf dem Filter. Damit scheint mir bewiesen zu sein, daß das Cholesterin mit dem Ricin keine Verbindung, die sich anders als Ricin allein verhält, eingegangen sein kann.

Versetzt man die beiden zusammengerollten Filter im Reagenzglas mit 5 ccm NaCl + 2 Tropfen verd. Salzsäure und neutralisiert nach ½stündigem Stehen die Lösung, so kann man nach Filtrieren zeigen, daß dies Filtrat das den roten Blutkörperchen durch die Salzsäure entzogene Ricin enthält, denn nach Zusatz von 2 % Taubenblut tritt wiederum sofort Agglutination ein.

Prof. Kobert wiederholte diese Versuche mit Lecithin-Merck; das Ergebnis war aber kein anderes als

mit dem Lecithin-Riedel. Auch beim Cholesterin änderte der Wechsel des Präparates nichts.

Ergebnis. Weder Lecithin noch Cholesterin gingen also eine Verbindung mit Ricin ein, auch konnte ich niemals bei meinen Versuchen Hämolyse beobachten. Diese Versuche ergeben also, daß die sogenannten Lipoide, d. h. Lecithin und Cholesterin, die Agglutination durch Ricin weder bei Organzellen noch bei Blutkörperchen hindern. Dies ist insofern interessant und wichtig, als die Lipoide sich zu einigen anderen Blutgiften ganz anders verhalten. So werden nach der landläufigen Ansicht z. B. Saponine und Schlangengifte durch Cholesterin in unwirksame Paarlinge umgewandelt, während die Lecithine die Wirkung der Saponine und Schlangengifte verstärken.

VII. Versuche über die Verdauung des Ricins.

Gegen die einheitliche Natur des Ricins hat sich vor allem der bekannte Pharmakologe Franz Müller[1]) in seiner Arbeit „Beiträge zur Toxikologie des Ricins" gewandt. Besonders auf Grund von Verdauungsversuchen mit Pepsin-Salzsäure kommt er zu der Ansicht, daß die Blutwirkung des Ricins im Gegensatz zu der Giftwirkung im lebenden Tier durch Pepsinverdauung aufgehoben werde. Dieses Ergebnis findet sich fast überall in der Literatur als feststehend wiedergegeben. Bei einer Nachprüfung kam ich jedoch zu anderen Resultaten; ich muß daher meine Versuche im einzelnen mitteilen. Zuvor aber scheint es mir notwendig, erst den Wortlaut der Müllerschen Versuche hier folgen zu lassen: „5 ccm Ricinlösung wurden 12

[1]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. 42, 1899, S. 302.

Stunden mit Pepsin-Salzsäure von 0,2 % H Cl, die in 5 Minuten eine größere Fibrinflocke glatt auflöste, bei 39° stehen gelassen, sodann alkalisch gemacht. Die verdaute Lösung zeigte keine konglutinierende Wirkung auf verdünntes Kaninchenblut.“ Es ist weder hieraus noch aus dem Zusammenhang zu ersehen, welche Konzentration die verwendete Ricinlösung hatte, und wieviel davon dem Blute zugesetzt wurde.

Zur Prüfung der Müllerschen Angaben stellte ich folgende Versuche an.

Eine 1 % Lösung von Ricin-Merck wurde 13×24 Stunden hintereinander mit Pepsinsalzsäure von 0,2 % HCl, die eine Fibrinflocke in einer halben Stunde glatt auflöste, bei 39° stehen gelassen. Ebenso wurde eine Kontrolle einer 1 % Lösung von Ricin-Merck mit Salzsäure von 0,2 % HCl-Gehalt 3 Tage bei 37—39° stehen gelassen. Verwendet wurde bei der ersten Lösung Pepsin-Witte.

Nach der angegebenen Zeit wird ein Teil der Flüssigkeit neutralisiert und vom Filtrat 10 ccm mit 10 ccm 2 % Katzenblut versetzt. Es tritt sofort Agglutination ein. Beim Filtrieren bleiben auf dem Filter die agglutinierten roten Blutkörperchen in siegellackartigen Klümpchen zurück.

Ebenso kann man nach Neutralisieren der Kontrolle zeigen, daß das Ricin sofort agglutinierend wirkt. Man kann nun die Agglutination noch stets deutlich nachweisen, wenn von beiden Verdünnungen 1 ccm neutralisiertes Filtrat der 1 % Lösung auf 10, 30, 100, 200, 500 ccm 2 % Katzenblut verwendet wird, und kann durch eine frisch zubereitete Lösung zeigen, daß diese durchaus nicht stärker agglutinierend wirkt, als die 3 Tage mit Pepsin-Salzsäure anverdaute Ricinlösung.

Dieser Versuch zeigt, daß Pepsinsalzsäure selbst bei dreitägiger Verdauung das Ricin in seiner agglutinierenden Kraft nicht zu schwächen vermag.

Da bei den Müllerschen Versuchen möglicherweise das sich bei der Pepsinverdauung bildende Pepton die Agglutination gehindert haben kann, so werden folgende Versuche angestellt:

A. 1 ccm Pepton (1:20) + 9 ccm NaCl + 5 ccm 2 % Kaninchenblut.

1 „ „ + 1 ccm Ricin + 8 „ „ 5 „ „
1 „ „ + 2 „ „ + 7 „ „ + 5 „ „
1 „ „ + 3 „ „ + 6 „ „ + 5 „ „
1 „ „ + 4 „ „ + 5 „ „ + 5 „ „
1 „ Ricin + 9 „ „ + 5 „ „

Nach wenigen Minuten sieht man in der Kontrolle, die nur Ricin bekommen hat, bereits am Boden einen dicken siegellackartigen Niederschlag, in den anderen Gläschen aber ist makroskopisch kein Niederschlag zu sehen, nur bei sorgfältiger Prüfung dünner Schichten sieht man, daß die Agglutination doch überall angefangen hat. Nach 24 Stunden ist in allen Gläsern außer Glas 1 Agglutination deutlich nachzuweisen.

B. 1) 1 ccm Pepton + 9 ccm NaCl + 5 ccm Kaninchenblut.

2) 1 „ Ricin + 1 ccm Pepton + 8 „ „ + 5 „ „
3) 1 „ „ + 2 „ „ + 7 „ „ + 5 „ „
4) 1 „ „ + 3 „ „ + 6 „ „ + 5 „ „
5) 1 „ „ + 4 „ „ + 5 „ „ + 5 „ „
6) 1 „ „ + 9 „ NaCl.

Auch hier in Glas 6 nach wenigen Minuten deutlich eintretende Agglutination. Nach 3 Stunden werden filtriert Glas 1, 2, 4 und 5. In Glas 2 ist die Agglutination am deutlichsten durch die auf dem Filter zurückbleibenden roten Blutkörperchen, in Glas 4 und 5 weniger deutlich. Die Agglutination fehlt natürlich ganz in Glas 1.

C. 1) 1 ccm Ricin + 5 ccm Pepton + 10 ccm Kaninchenblut.

2) 1 „ „ + 7 „ „ + 10 „ „
3) 1 „ „ + 10 „ „ + 10 „ „
4) 1 „ „ + 5 „ NaCl + 10 „ „

Die Agglutination wurde in Glas 2 und 3 verzögert, aber nicht vollkommen aufgehoben; sie war nach 24 Stunden noch in sämtlichen Gläsern nachzuweisen.

D. 1 ccm Ricin + 9 ccm Pepton } + 3 Tropfen unverdünntes
1 „ „ + 9 „ NaCl } Kaninchenblut.

Nach 24stündigem Stehen ergibt die Untersuchung, daß das Pepton die Agglutination gehindert, aber keine Hämolyse verursacht hat.

Dieser vierfache Versuch beweist, daß das Pepton die Agglutination durch Ricin zwar verlangsamt, aber

keineswegs ganz aufhebt, wofern die Dose des Peptons nicht übergroß ist. Es ist daher kaum anzunehmen, daß in den Müllerschen Versuchen das gebildete Pepton die agglutinierende Wirkung gehindert hat.

Ich lasse noch einige weitere Versuche folgen, die zur Klärung der Beurteilung der Müllerschen Versuche herangezogen werden können.

20 ccm Kaninchenhirnzellenbrei werden mit 5 ccm Ricinlösung, entsprechend 0,2 g Same, versetzt. Es erfolgt sehr rasch Agglutination der Hirnzellen, so daß rasche Filtration möglich wird. Zu dem klaren Filtrat werden nochmals Hirnzellen gesetzt, bis eine Probe des neuen Filtrates auf weitere Hirnzellen nicht mehr wirkt. Nun wird zum Gesamtfiltrat tropfenweis unverdünntes Menschenblut gesetzt, welches aber gar nicht agglutiniert wird.

Wenn Hirnzellen nur das Toxin aufzunehmen imstande wären und neben diesem Toxin ein gesondertes Agglutinin vorhanden wäre, hätte hier die Gesamtmenge des Agglutinins noch vorhanden sein müssen. Da aber im zugesetzten Blute auch nicht einmal beim ersten Tropfen Agglutination stattfand, ist die Annahme, daß ein gesondertes Toxin für Gehirnzellen neben einem nur auf Blut wirkenden Agglutinin vorhanden sei, als unrichtig erwiesen.

Bei einem zweiten Versuch werden wiederum 20 ccm Hirnzellenbrei mit 5 ccm Ricinlösung (0,2 g Same entsprechend) versetzt. Das nach erfolgter Agglutinierung erhaltene Filtrat wird nach und nach mit 10 ccm unverdünntem Kaninchenblut versetzt, wobei die letzten 2 ccm nicht mehr agglutiniert werden. Nun wird filtriert und die durchs Filter gegangenen Blutkörperchen durch Zentrifugieren entfernt. Die dadurch erhaltene klare Flüssigkeit war weder imstande, auf Blutkörperchen noch auf Hirnzellen irgend welche sichtbare Wirkung auszuüben.

Trotzdem wirkten 5 ccm davon, einem Mittelkaninchen subkutan eingespritzt, binnen 24 Stunden tötlich.

Dieser Versuch beweist, daß die Absorption des Ricins sowohl durch Gehirnzellen als durch Blutkörperchen Spuren des Giftes ungebunden läßt, die bei der enormen Empfindlichkeit der Kaninchen diese noch zu töten imstande sind. Analog wie Fermentprozesse niemals ganz quantitativ verlaufen, sondern Spuren der zu zersetzenden Substanz unzersetzt lassen, so ist auch der physikalisch-chemische Prozeß des Adsorption des Ricins und wohl aller Agglutinine an die Zellen ein nicht genau quantitativer. Dies muß man berücksichtigen, falls man den folgenden Versuch richtig deuten will.

Zu 5 ccm Ricinlösung (0,2 g Same entsprechend) werden so lange Kaninchenblutkörperchen gesetzt, bis auch nach 24stündiger Einwirkung keine Agglutination mehr stattfindet. Nun wird filtriert, aus dem roten Filtrat die durchgegangenen Blutkörperchen abzentrifugiert und von der neuen klaren, farblosen Flüssigkeit 5 ccm einem Mittelkaninchen unter die Haut gespritzt. Nach 24 Stunden ist das Tier schwer krank und bald darauf stirbt es. Die Sektion ergibt punktförmige Ekkymosen im Netz und auf beziehungsweise unter der Serosa des Ileums. Die Plaques des Darmkanales sind z. T. geschwollen und gerötet, ebenso die Mesenterialdrüsen. In der Bauchhöhle findet sich ein seröser mäßiger Erguß. Alle diese Befunde sprechen für eine typische Ricinusvergiftung.

Die Anhänger der Ansicht Müllers werden geneigt sein, aus diesem Versuche zu schließen, daß er ihre Ansicht als richtig erweise. Es sei eben durch die roten Blutkörperchen nur das Agglutinin, aber fast gar nichts vom Toxin verankert, und dieses habe daher das Kaninchen getötet. Ich bin der Ansicht, daß auch hier lediglich eine nicht ganz quantitative Bindung des Ricins an die Blutkörperchen stattfand. Der nicht gebundene minimale Ricinrest war noch

groß genug, klassische Vergiftung des Tieres hervorzurufen.

Ich glaube aus dem von mir vorgebrachten tatsächlichen Material den Schluß ziehen zu können, daß die Müllerschen Versuche, auf denen sich die Annahme eines gesonderten Ricintoxins und Ricinagglutinins aufbaut, nicht die Beweiskraft haben, welche man ihnen ganz allgemein bisher zugeschrieben hat.

VIII. Wirkung des Ricins auf Kaltblüter.

In der anfangs zitierten Arbeit von Cushny[1]) berichtet dieser über Versuche, die er mit Fröschen unternommen hat und gibt an, daß es ihm gelungen sei, nach einiger Zeit starke Blutungen im Magen zu erhalten, ja, daß er mit dem Mageninhalt weitere Frösche vergiften konnte. Die von ihm angewandten Dosen sind leider nicht genau angegeben. Versuche, die ich in dieser Hinsicht anstellte, führten mich zu etwas anderen Resultaten, die ich hier mitteile.

Versuch 1. Injiziert wurden 4 Kröten und zwar
2 Kröten mit 2 ccm eines 2 % Ricinauszugs.
2 „ „ 4 „ „ 2 % „ , und zwar je 2 ccm an 2 aufeinander folgenden Tagen.

Die Kröten starben nach 2 resp. 3 Tagen mit dem typischen Ricinbefund, d. h. sie zeigten Injektion des Magens und des Darms; sonst keine auffallenden Veränderungen. Kein blutiger Schleim im Magen.

Der Magendarminhalt einer Kröte, die 4 ccm erhalten hatte, sowie die Magendarmschleimhaut wurden in einem Mörser mit Sand und 10 ccm NaCl, sowie mit 2 Tropfen HCl verrieben und das neutralisierte Filtrat einem Kaninchen von 1500 g injiziert, das nach 2 Tagen starb und folgenden Befund aufwies: Blutungen im Netz, Hyperämie des Darmes, Schwellung des lymphatischen Apparates.

[1]) Cushny, Archiv f. experimentelle Pathologie, Bd. **41**, 1898, S. 439.

Mikroskopisch: Milz sehr blutreich; in den Follikeln weniger als in der Pulpa sieht man fast auf jedem Schnitt mehrere Leukocyten mit weitgehenden Kernveränderungen und häufig freiliegende Kerntrümmer bei einander.

Knochenmark blutreich, im übrigen ziemlich starkes Fettmark. Von den weißen Blutkörperchen zeigt ein sehr großer Teil intensive Zerfallserscheinungen. Es scheinen ein- und mehrkernige Zellen davon betroffen zu sein. Rote Blutkörperchen unverändert.

Niere, zahlreiche verfettete Glomeruli und Kanälchen, neben ganz normalen, viele Gefäße sind dicht mit Blutkörperchenhaufen angefüllt. Auffallend an diesen mit Blut gefüllten Gefäßen ist die Verfettung der Epithelien.

Versuch 2. Ferner erhielten 4 Frösche von einer 5% Emulsion:

3 Frösche je 2 ccm einer 5% Ricinusölemulsion.
1 Frosch 4 „ „ 5% „

Alle 4 Frösche starben ohne auffallenden Befund, die am stärksten injizierten Gefäße zeigte der Frosch mit 4 ccm Injektionsflüssigkeit. Doch war bei keinem blutiger Mageninhalt nachzuweisen.

Versuch 3. Es wurden injiziert
9 Fröschen je 2 ccm eines 2% Ricinusauszugs.

Davon starben 4 nach 2 Tagen,
4 nach 1 Tag,
1 nach 3 Tagen.

Und zwar hatten 3 blutigen Schleim im Magen. Dieser blutige Schleim zweier Frösche wurde mit NaCl-Lösung und 2 Tropfen HCl versetzt und an zwei aufeinander folgenden Tagen zu je 5 ccm einem Kaninchen von 1400 g injiziert. Das Kaninchen starb plötzlich am Nachmittag des 2. Tages unter Krämpfen.

Sektionsbefund war folgender: Injektionsstelle und Brusthöhle normal. Bauchfell glatt, in der Bauchhöhle keine Ergüsse. Im großen Netz einige punktförmige Blutungen, mehrere flache Blutungen in der Schleimhaut des Dünndarms und des Coecums. Dünndarm in seiner ganzen Ausdehnung hyperämisch. Peyersche Plaques geschwollen, blutreich. Mesenterialdrüsen stark vergrößert und sehr blutreich. Knochenmark hyperämisch.

Ergebnis. Der anatomische Befund entspricht vollkommen dem bei Ricinvergiftung der Warmblüter. Daraus ist zu schließen, daß in dem Mageninhalt der beiden Frösche und in Versuch 1 im Mageninhalt der Kröte Ricin enthalten gewesen ist.

Versuch 4. Es erhielten 3 Frösche 4 ccm 2 % Ricinusauszug je 2 ccm an 2 aufeinanderfolgenden Tagen, und zwar starb 1 nach 3 Tagen und 2 nach 2 Tagen. Die Veränderungen pathologischer Art bestanden in Injektion der Gefäße des Magens und Darms. Kein Mal enthielt der Magen blutigen Schleim.

Versuch 5. Agglutinationsversuche mit dem Mageninhalt zum Nachweis des Ricins wurden zahlreich angestellt, aber alle mit negativem Ergebnis. Der Magendarminhalt wurde in einer Reibschale zusammen mit dem Magen, Darmschleimhaut mit NaCl + 2 Tropfen HCl versetzt und mit Sand zerrieben, nach 2stündigem Stehen neutralisiert und filtriert. Das Filtrat wurde auf seine Agglutinationsfähigkeit auf Blutkörperchen geprüft.

Es wurde benutzt:

2 × der Mageninhalt von Fröschen, die 2 ccm einer 5 % Emulsion bekommen hatten und nach 24 Stunden gestorben waren.

1 × der Mageninhalt eines Frosches, der 4 ccm Emulsion bekommen hatte.

1 × der Mageninhalt einer Kröte, die 2 ccm eines 2 % Ricinusauszugs erhalten hatte.

1 × der Mageninhalt eines Frosches, der 4 ccm eines 2 % Ricinusauszugs erhalten hatte und nach 3 Tagen gestorben war.

3 × der Mageninhalt von Fröschen, die 2 ccm eines 2 % Ricinusauszugs erhalten hatten und nach 2 Tagen gestorben waren.

In allen diesen Fällen ergab also der Mageninhalt keine Agglutination von Blutkörperchen.

Ich muß mich daher dahin aussprechen, daß der Übergang des subkutan eingespritzten Ricins in den Magen von Fröschen und Kröten durch die Agglutinationsprobe meist nicht nachzuweisen ist, sondern wohl nur bei enorm hohen Dosen erfolgt.

Lebenslauf.

Ich wurde am 14. Januar 1888 als Sohn des verstorbenen Kaufmanns William Reid geboren. Bis zum Einjährig-Freiwilligen-Examen besuchte ich das Schiller-Realgymnasium zu Stettin, dann das Falk-Realgymnasium zu Berlin und bestand das Abiturientenexamen in Bützow in Mecklenburg-Schwerin. Ich studierte in München, Berlin und Rostock und bestand das ärztliche Staatsexamen am 10. Juni 1913 in Rostock. Mein praktisches Jahr verbrachte ich am Eppendorfer Krankenhaus auf der Abteilung von Herrn Dr. Kiessling und Herrn Prof. Dr. Nonne und an der Irrenanstalt Gehlsheim bei Rostock. Meine Approbation erfolgte am 1. Juli 1914 in Rostock.

George Reid,
Medizinalpraktikant.